دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش کیفی

باکتری *M. tuberculosis*

با روش Real-Time PCR

STEM CELL TECHNOLOGY
شرکت فناوری بن یاخته

Doc. #: IFU-TB-01 Doc. Version: 11 Revision Date: 08-02-2023

فهرست مطالب

شماره رفرانس ۳

شرح کیت ۳

اصول ۳

اطلاعات پاتوژن ۳

محتویات کیت ۴

نگهداری و انتقال کیت ۵

نکات احتیاط عمومی ۶

هشدارها و محدودیت‌ها ۷

عوامل تداخلی ۸

کنترل داخلی(Internal Control) ۹

آماده سازی ۹

برنامه دمایی ۱۱

شکل ۴. تنظیمات دستگاه ریل تایم روتورژن ۱۳

آنالیزنتایجRotor-Gene ۱۴

نشانه ها ۱۶

اطلاعات تماس ۱۷

شماره رفرانس

- BONTB-24

شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به صورت Real-Time ساخته شده است. این محصول برای تشخیص سویه‌های حاد بیماری سل (*M. microti*، *M. caprae*، *M. canetti*، *M. bovis BCG*، *M. africanum*، *M. bovis*) کاربرد دارد. نتایج تشخیصی به‌دست‌آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده‌های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

اصول

تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم باکتری می‌باشد. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیر شده از طریق فلوروسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلوروسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به بازکردن مجدد لوله‌های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.

اطلاعات پاتوژن

سل یک بیماری مسری و مزمن است که توسط باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوسیس (*M. tuberculosis*) ایجاد می شود. در سال ۱۹۳۳، این بیماری به دلیل شیوع گسترده در سراسر دنیا، به عنوان یک معضل بهداشت عمومی شناخته شد و تلاش‌ها برای ریشه‌کن کردن آن تاکنون ادامه یافته است؛ هرچند به دلیل مهاجرت افراد بیمار و مقاومت آنتی‌بیوتیکی، این بیماری همچنان به عنوان یکی از مهم‌ترین عفونت‌های واگیردار شناخته میشود.

سویه‌های حاد سل از جمله *M. microti*، *M. caprae*، *M. canetti*، *M. bovis BCG*، *M. africanum* و *M. bovis* باعث ایجاد عفونت در ریه و بافت‌های لنفاوی مرتبط می‌شوند. عفونت از طریق تنفس قطرات تنفسی حاوی پاتوژن و توسط افراد مبتلا به سل ریوی فعال منتقل میشود. پس از استنشاق، باکتری در کیسه‌های هوایی ریه مستقر شده و از طریق گردش خون لنفاوی و هماتوژن، میتواند به سایر قسمت‌های ریه و گاهی سایر اندام‌ها انتشار یابد. شایع‌ترین شکل بیماری سل ریوی

است؛ اگرچه رخداد سایر انواع بیماری مانند سل روده‌ای، استخوانی، منتژیت و غیره نیز گزارش شده است.

عفونت اولیه در ۱۰٪ افراد آلوده و در ۸۰٪ مواقع، طی یک بازه‌ی ۲ ساله، شکل فعال بیماری را ایجاد میکند. در ۹۰٪ باقی‌مانده، سیستم ایمنی عفونت را کنترل میکند و فرد، عفونی یا بدون علائم نیست. تخمین زده می شود که یک سوم جمعیت جهان به سل نهفته مبتلا هستند؛ یعنی این افراد آلوده به باکتری هستند، اما هنوز بیمار نشده اند و با این حال می توانند عفونت را منتقل کنند. در این حالت، باکتری‌های سل میتوانند تا سال‌ها به صورت غیرفعال بمانند. هنگامی که سیستم ایمنی ضعیف می شود، عفونت نهفته می تواند دوباره فعال شود.

هنگامی که شکل فعال بیماری رخ می دهد، علائم (سرفه، تب، تعریق شبانه، کاهش وزن و غیره) ممکن است برای چندین ماه خفیف باشد؛ به همین دلیل ممکن است بیماران برای مراجعه به پزشک تعلل کرده و به این ترتیب بیماری را به دیگران منتقل کنند. در طول یک سال، یک بیمار سل می تواند ۱۰ تا ۱۵ نفر را از طریق تماس نزدیک مبتلا کند. در صورت عدم دریافت درمان مناسب، نزدیک به دو سوم بیماران جان خود را از دست خواهند داد. استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای تشخیص سریع‌تر، حساس‌تر و اختصاصی‌تر از روش‌های سنتی آزمایشگاهی، امکان بهبود دانش اپیدمیولوژی عفونت و تصمیم‌گیری برای کنترل آن را فراهم می‌کند.

محتویات کیت

Title	24 Tests
	Volume per Vial
TB Master-A	240 µl/tube × 1
TB Master-B	120 µl/tube × 1
Positive Control TB	100 µl/tube × 1
Internal Control	300 µl/tube × 1

جدول ۱. محتویات کیت

نگهداری و انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای۲۰- درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری‌گردد، همچنین به منظور انتقال و جابه‌جایی کیت از یونولیت با درب و یخ‌خشک استفاده نمایید.
- ✓ نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هیچ‌گاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.
- ✓ این کیت نیاز به حمل برروی بسته‌های یخزده (Frozen Ice Pack) را دارد.
- ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان‌طور که روی برچسب بسته‌بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
- ✓ از چرخه‌های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و درنتیجه عدم کارایی کیت می‌شود.
- ✓ از قراردادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.
- ✓ معرف‌ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لوله‌ها را به طور مختصر سانتریفیوژ کنید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به طور یکنواخت مخلوط شده‌اند.

مواد و تجهیزات مورد نیاز که باید توسط کاربر تدارک دیده شود:

۱. کیت استخراج DNA از مایکوباکتریوم
۲. سمپلر قابل تنظیم در اندازه‌های مختلف و نوك سمپلر فیلتردار
۳. سانتریفوژ رومیزي
۴. بلوك خنك كننده
۵. وایتکس ۱۰ درصد
٦. گان و دستکش
۷. دستگاه با قابلیت خوانش در کانال‌های فلوروسنت مخصوص Cycling Green, Cycling Orange
۸. نرم‌افزار دستگاه مورد استفاده
۹. استریپ و کپ مناسب دستگاه مورد استفاده

نکات احتیاط عمومی

۱. لطفاً دستورالعمل را با دقت بخوانید و قبل از استفاده محصول با تمام اجزای کیت آشنا شوید و درحین‌کار دستورالعمل را دقیقاً دنبال کنید.

✓ لطفاً قبل از استفاده، ابزارهای Real-Time PCR سازگار را بررسی کنید و فرآیند را با آن‌ها جلو ببرید.

✓ از کیت یا اجزای کیت پس از تاریخ انقضا استفاده نکنید.

✓ در کیت آزمایش از ماده دیگری استفاده نکنید.

۲. از سرسمپلرهای فیلتردار و RNase & DNase free استفاده کنید.

۳. نگهداری و تخلیص نمونه‌های گرفته شده، باید در محلی کاملا جدا از محل نگهداری و آماده سازی مسترمیکس صورت پذیرد.

٤. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طورکامل در دمای اتاق ذوب شود.

٥. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد را به خوبی پیپتاژ نمایید و به‌طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به‌طورکامل توصیه می‌شود.

٦. تمام مراحل مربوط به تهیه مسترمیکس باید بر روی یخ یا جعبه‌های سرد (Cooling Box)انجام شود. استوک اصلی مربوط به مسترمیکس بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل شود.

۷. هنگام کار با مواد شیمیائي، روپوش مناسب آزمایشگاهي، دستکش یکبار مصرف، و عینك‌هاي محافظ داشته باشید.

۸. کیت حاوی کنترل مثبت است. برای جلوگیری از آلودگی که ممکن است باعث ایجاد مثبت کاذب شود، کنترل مثبت را از سایر مواد موجود در کیت کاملا جدا کنید.

۹. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرآیند کار را با دقت انجام دهید.

۱۰. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش‌ها باید مرتباً تعویض شوند.

۱۱. از تیپ‌های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت از میکروتیپ‌های فیلتردار برای جلوگیری از ورود آلودگی RNA و DNA استفاده کنید.

۱۲. لطفاً لوله‌های PCR را با دو دستکش یکبارمصرف بسته‌بندی کرده و به درستی دور بیندازید. لوله‌های PCR را پس از تکثیر باز نکنید.

۱۳. از استفاده ی مجدد مواد یکبار مصرف بپرهیزید.
۱٤. مواد موجود درکیت که بلا استفاده شده اند، کیت استفاده شده و زباله‌ها باید به درستی دور انداخته شوند.
۱۵. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اسپری اتانول ۷۵٪ و وایتکس ۱۰٪ تمیز کنید.

هشدارها و محدودیت‌ها

۱. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP[۱] توسط پرسنل آموزش دیده دارای پوشش حرفه ای و محافظ (PPE)[۲] انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-2 انجام شود. (استفاده از دستورالعمل: Interim Laboratory Biosafety Guideline For Handling and Processing Specimen Associated)
۲. پیشنهاد می‌شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود و همینطور بعد از کار لامپ UV زده شود.
۳. پیشنهاد می‌شود آماده‌سازی مخلوط واکنش از فضای اضافه کردن نمونه و کنترل مثبت جدا باشند زیرا ممکن است نتایج مثبت کاذب به وجود آید.
۴. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش، آن را در تاریکی نگهداری نمایید.

[۱] Good Laboratoty Practice
[۲] Personal Protective Equipment

کنترل‌ها

۱. کنترل منفی (NTC): همواره یک نمونه کنترل منفی حاوی آب بجای نمونه استفاده شود.
۲. کنترل مثبت (PTC): از کنترل مثبت کیت به‌جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

نگهداری نمونه‌های گرفته شده

نمونه می‌تواند کمتر از ۸ ساعت در یخچال با محدوده دما از ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای نگهداری طولانی‌مدت آن، باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شده و نگهداری شود.

تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

عوامل تداخلی

EDTA (0.5M)، HCl (1N)، دانه‌های سیلیس (1μl)، خون (1μl)، اوره (۴۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و بافر لیز عملکرد آزمایش را مهار می‌کنند. وجود مهارکننده در واکنش با ژن کنترل داخلی قابل ردیابی است.

خالص‌سازی نوکلئیک اسید

جداسازی اسید نوکلئیک باید توسط کیت‌های استخراج مایکوباکتریوم موجود در بازار مطابق پروتکل‌های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود.
مواد نمونه باید از سلول‌های جدا شده از نمونه‌های خلط، مایع BAL، ترشحات نای، مایع مغزی نخاعی، مایع معده، و یا صفاق استخراج شده باشد.
کیت استخراج DNA در این کیت گنجانده نشده است.

کنترل داخلی(Internal Control)

این کیت به همراه یک کنترل داخلی برای مصرف کننده نهایی تهیه شده است. این امر به کاربر نهایی اجازه می‌دهد تا هم فرآیند تخلیص را چک کند و هم احتمال وجود مواد مهار کننده PCR را بررسی نماید. به طور کل در این حالت کنترل داخلی موجود در کیت را به مقدار**0.2 µl** به ازاء هر **1µl** از حجم حل کردن نهایی ژنوم باکتری TB اضافه می‌شود. برای مثال اگر ژنوم تخلیص شده از TB را در 50µl آب حل می‌کنیم باید در هنگام تخلیص نمونه به آن 10µl کنترل داخلی اضافه کنیم. به بیان دیگر حجم کنترل داخلی اضافه شده تنها تابعی از میزان الوشن (elution) نهایی می‌باشد. این کنترل داخلی را می‌توان به طور مستقیم به بافر لیز اضافه کرد و یا آن را به مخلوط بافر لیز و نمونه اضافه نمود. این نکته قابل ذکر است که اضافه کردن کنترل داخلی به بافر لیز یا مخلوط بافر لیز و نمونه باید به صورت تازه صورت گیرد. همچنین کنترل داخلی به هیچ عنوان نباید به خود نمونه به صورت مستقیم و در غیاب بافر لیز اضافه شود. همچنین می‌توان کنترل داخلی را تنها در طی مرحله PCR اضافه کرد که در این حال هیچ گونه کنترل بر روی مرحله تخلیص وجود نخواهد داشت. در این حالت 1µl از کنترل داخلی به 15 µl از master mix اضافه شده و سپس مقدار 15 µl از این مخلوط با 10 µl از نمونه تخلیص شده مخلوط می‌گردد. در صورت موفق بودن PCR ،کنترل داخلی در CT<34 در کانال نارنجی سیگنال می دهد.

آماده‌سازی

۱. ابتدا لوله‌ها را روی رک یخ بگذارید تا محتویات آن‌ها ذوب شوند و لوله‌های بافر واکنش، پرایمر پروب و کنترل مثبت را به آرامی پیپتاژ و یا ورتکس کنید، سپس اسپین نمایید.

۲. در یک ویال ابتدا به تعداد نمونه ها مخلوط مسترمیکس آماده نمایید: چنانچه کنترل داخلی (IC) را در زمان استخراج به نمونه ها اضافه کردید، به ازای هر نمونه مقدار ۱۰ میکرولیتر از Master-A و سپس 5 میکرولیتر از Master-B اضافه نمایید (جدول ۲). پس از میکس نمودن مسترها در نهایت ۱۵میکرولیتر به ازای هر نمونه به میکروتیوب واکنش اضافه نمایید.

جدول نحوه آماده سازی واکنش	
TB Master-A	10 µl
TB Master-B	5 µl
Total Volume	15 µl

جدول ۲. آماده سازی مسترمیکس برای نمونه هایی که IC در زمان استخراج اضافه شده است.

۳. چنانچه کنترل داخلی را در زمان استخراج استفاده نکردید و تنها در زمان PCR می خواهید به مسترمیکس TB اضافه کنید، پس از اضافه نمودن Master-A و Master-B به ویال، **1µl** از کنترل داخلی را نیز به ازای هر نمونه به مسترمیکس خود اضافه نمایید. در نهایت، پس از میکس نمودن مسترها، ۱۵میکرولیتر از میکس مسترها را به ازای هر نمونه به میکروتیوب واکنش اضافه نمایید (جدول ۳).

جدول نحوه آماده سازی واکنش	
TB Master-A	10 µl
TB Master-B	5 µl
IC Control	1 µl
Total Volume	16 µl
از 16 µl به مقدار 15 µl به ازاء هر نمونه برداشته شود .	

جدول ۳. آماده سازی مسترمیکس برای نمونه هایی که IC در زمان PCR اضافه می شود.

۴. میکروتیوب ها را به منطقه کار با اسید نوکلئیک انتقال دهید، ۱۰ میکرولیتر از کنترل مثبت و ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌های بیمار را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید (جدول ٤) . سپس تیوب‌ها را در دستگاه ریل تایم قرار داده و دستگاه را طبق جدول ۵ تنظیم نمایید.

Title	Volume
Master mix	15 µl
Sample/PTC/NTC	10 µl
Total Volume	25 µl

جدول ۴. آماده سازی واکنش

نکته:

۱. در هر بار انجام تست یک لوله به عنوان No Template Control (NTC) باید گذاشته شود. در NTC به جای نمونه استخراج شده از آب استفاده می‌شود که برای کنترل آلودگی واکنش کاربرد دارد.
۲. در نظر داشته باشید که درب ویال کنترل مثبت را تنها در زیر هود آلوده باز کنید.

برنامه دمایی

دستورالعمل برای دستگاه‌های Real-Time PCR دارای کانال Green توصیف شده است. پس از تنظیم کردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه اندازی کنید. درصورت استفاده از دستگاه ABI StepOne گزینه رنگ رفرنس داخلی (Passive Refrence) را حذف کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه Rotor Gene به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید. مقادیر دمایی هر قسمت در جدول ۵ آورده شده است.

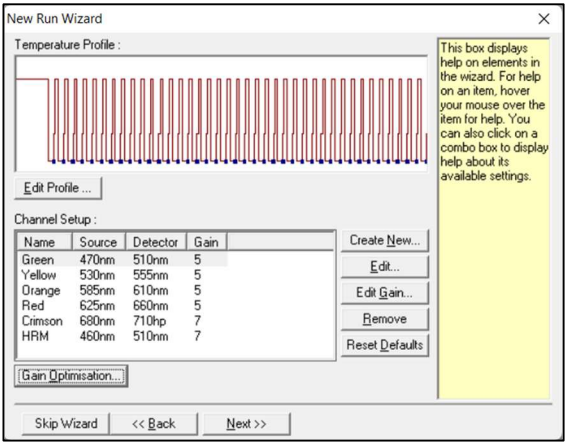
	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 ℃	5 min	1
Denaturation	95 ℃	20 sec	45
Annealing and Acquisition on Channel Green and Texas RED	58 ℃	60 sec	

جدول ۵. برنامه دهی دستگاه ریل تایم

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه ها

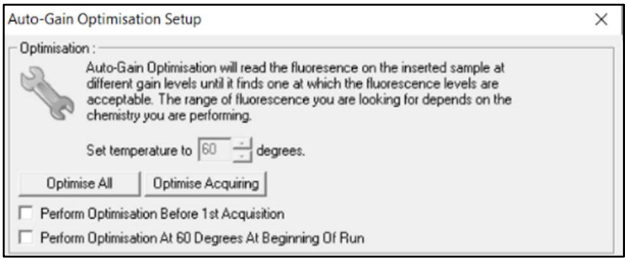
دستگاه **Rotor-Gene**

بدین منظور در دستگاه Rotor-gene گزینه‌ی Gain Optimization را انتخاب کنید (شکل ۱).



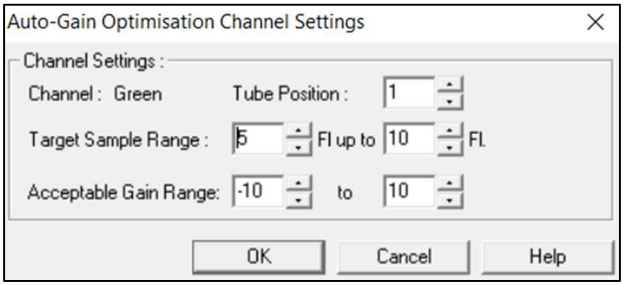
شکل ۱. تنظیمات دستگاه ریل تایم روتورژن

در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimise Acquiring برای هر ۲ کانال سبز و نارنجی بازه‌ی Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش‌فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲).



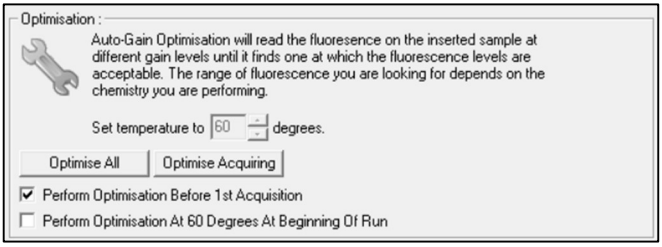
شکل ۲. تنظیمات دستگاه ریل تایم روتورژن

همچنین Gain دستگاه باید برمبنای تیوب اول انجام شود (شکل ۳).



شکل ۳. تنظیمات دستگاه ریل تایم روتورژن

پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی Perform Optimization Before 1st Acquisation را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل ۴).



شکل ٤. تنظیمات دستگاه ریل تایم روتورژن

آنالیزنتایج Rotor-Gene

۱. آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در کانال رنگی سبز، آستانه را در بازه‌ی 0.02 قرار دهید.

۲. از پنجره Quantitation Analysis گزینه‌ی Slope Correct را انتخاب نمایید.

در مرحله بعد از قسمت آنالیز باید نتایج را به صورت زیر تفسیر کرد (جدول ٦):

۱ .سیگنال فلورسانس در کانال (A.FAM=green) کاملا مشخص است.

نتیجه تست برای باکتری TB مثبت است و نمونه تخلیص شده از نمونه حاوی باکتری TB بوده است. در این حالت، وجود سیگنال فلورسانس در کانال نارنجی اهمیت ندارد، زیرا در صورت بالا بودن غلظت اولیه ژنوم باکتری TB سیگنال در کانال نارنجی می‌تواند بسیار ضعیف باشد یا اصلا وجود نداشته باشد.

۲ .هیچ سیگنال فلورسانسی در کانال (A.FAM=Green channel) مشاهده نمی‌شود. در همین حین سیگنال در کانال نارنجی مربوط به کنترل داخلی دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۸ تا ۳۲ می باشد. در این حالت نمونه منفی در نظر گرفته می شود.

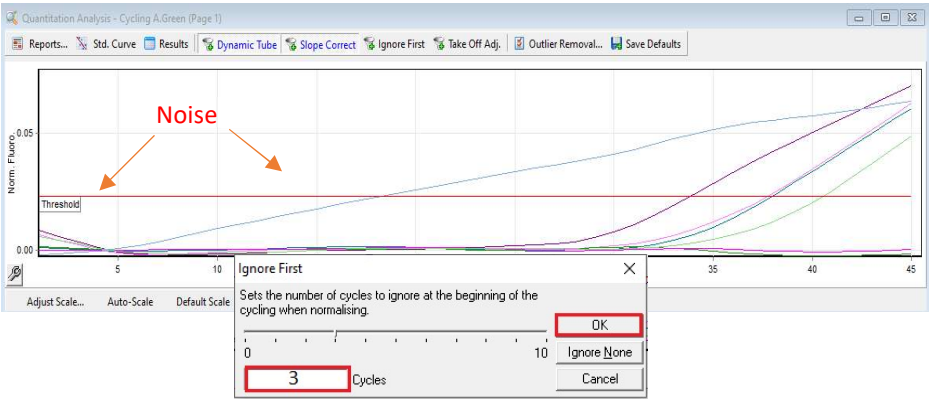
۳ .هیچ سیگنال فلورسانسی در کانالA.FAM و کانال Orange قابل مشاهده نیست.

در این حالت هیچ گونه نتیجه گیری در مورد تست نمی‌توان انجام داد. تست باید دوباره تکرار شود.

Green	Orange	Result
+	-	TB-Positive
-	Ct≤32	TB-Negative
-	-	Invalid

جدول ٦. تفسیر نتایج

۳- در صورت مشاهده Noise اولیه در نمودار در حالت Linear مطابق شکل ۵، از گزینه‌ی Ignore First، 3-5 سیکل را بسته به Noise مشاهده شده، Ignore نمایید.



شکل ۵. تنظیمات دستگاه در صورت وجود Noise

میزان حساسیت : Analytical Sensitivity

برای تعیین حساسیت تحلیلی کیت Senmurv M. tuberculosis PCR ، یک سری رقت استاندارد از ۱۰ تا ۰/۱ اسمی معادل ژنوم بر میکرولیتر تنظیم شد و روی Rotor-Gene Q تجزیه و تحلیل شد. ژن مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ترکیب با کیت Senmurv M. tuberculosis PCR در ۳ روز مختلف و در ۸ تکرار آزمایش انجام شد. نتایج با تجزیه و تحلیل پروبیت تعیین شد. حد تشخیص تحلیلی کیت Senmurv M. tuberculosis PCR در دستگاه Rotor-Gene Q 0.5 = Copy/ μl این به این معنی است که به احتمال ۹۵٪ 5 Copy/reaction شناسایی گردد.

نشانه ها

IVD	InVitro Diagnostic Medical Device	برای مصرف آزمایشگاهی
REF	Catalog Number	کد کالا
LOT	Batch Number	شماره بچ تولید شده
	Temprature Limitation	محدودیت دمایی
	Concult Instructon For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficent for <n> tets	تعداد تست
	Use by	تاریخ انقضا
	Manufacturer	آدرس

.

شرکت فناوری بن یاخته -گروه سین مورو

دفتر مرکزی : تهران، سعادت آباد،خیابان استاد محمدعلی کشاورز (۲٤ متری)، کوچه دوم شرقی، پلاک ۹، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی : ۱۹۹۷۷۷۵۵۵۵ پشتیبان فنی : ۰۹۳۰۱۸۲۱۶۰۱

تلفن های تماس : ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

Web Site: www.Senmurv.co Email: info@senmurv.ir